

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2002-34575
(P2002-34575A)

(43) 公開日 平成14年2月5日 (2002.2.5)

| (51) Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | テームコード* (参考) |
|-------------------------------|-------|---------------|--------------|
| C 1 2 N 15/09 | Z N A | C 1 2 N 1/21 | 4 B 0 2 4 |
| 1/21 | | C 1 2 Q 1/02 | 4 B 0 6 3 |
| 5/10 | | 1/66 | 4 B 0 6 5 |
| C 1 2 Q 1/02 | | C 1 2 N 15/00 | Z N A A |
| 1/66 | | 5/00 | B |
| 審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 12 頁) | | | |

(21) 出願番号 特願2000-228757 (P2000-228757)

(22) 出願日 平成12年7月28日 (2000.7.28)

(71) 出願人 000001959

株式会社資生堂

東京都中央区銀座7丁目5番5号

(72) 発明者 仲西 城太郎

神奈川県横浜市金沢区福浦2-12-1 株
式会社資生堂第二リサーチセンター内

(72) 発明者 日比野 利彦

神奈川県横浜市金沢区福浦2-12-1 株
式会社資生堂第二リサーチセンター内

(74) 代理人 100060782

弁理士 小田島 平吉 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト I I 型 5 α -レダクターゼのプロモーター遺伝子およびその用途

(57) 【要約】

【課題】 ヒト I I 型 5 α -レダクターゼ遺伝子の発現を調節するための手段の提供。

【解決手段】 ヒト I I 型 5 α -レダクターゼ遺伝子のプロモーター遺伝子領域を含む DNA 分子およびその改変体、ならびにこれらを使用する I I 型 5 α -レダクターゼの転写調節物質のスクリーニング方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒトに由来するⅠⅠ型5 α -レダクターゼ遺伝子のプロモーターとして作用する単離されたDNA分子であって、(a) 配列番号1で表されるDNA配列からなるポリヌクレオチドにおいて、位置1～6022番目の連続したDNA配列からなるポリヌクレオチド、(b) (a)のポリヌクレオチドのフラグメントであって、位置5952番目(T)の転写開始点を含む少なくとも約50の連続したDNA配列からなるフラグメント、ならびに(c) (a)のポリヌクレオチドのDNA配列において、1個または複数のヌクレオチドが置換、欠失および/または付加することにより改変されており、そして位置5952番目(T)の転写開始点を含む少なくとも約50の連続したDNA配列からなるポリヌクレオチドを包含するポリヌクレオチド、からなる群より選ばれるDNA分子。

【請求項2】 請求項1に記載のDNA分子を担持する組換え発現ベクター。

【請求項3】 該DNA分子に操作可能に連結されたレポーター遺伝子をさらに担持する請求項2記載の発現ベクター。

【請求項4】 請求項1に記載のDNA分子または請求項2に記載の発現ベクターを含む大腸菌または哺乳動物細胞。

【請求項5】 該DNA分子に操作可能に連結されてレポーター遺伝子をさらに含む請求項4記載の大腸菌または哺乳動物細胞。

【請求項6】 請求項5に記載の哺乳動物細胞を被検体の存在下で培養し、そして培養物におけるレポーター遺伝子の発現の程度の多寡を被検体のヒトⅠⅠ型5 α -レダクターゼ転写調節能の指標とすることを特徴とする被検体の該転写調節能の評価方法。

【請求項7】 配列番号1で表されるDNA配列中に存在する転写因子結合モチーフに対する転写因子をコードする単離されたDNA分子を含有する発現ベクターを、導入した哺乳動物細胞を培養することによるヒトⅠⅠ型5 α -レダクターゼの発現の亢進または抑制方法。

【請求項8】 請求項7記載の方法を被検体の存在下で行い、該被検体の存在に起因して変化するヒトⅠⅠ型5 α -レダクターゼの発現量の多寡を該被検体のヒトⅠⅠ型5 α -レダクターゼ転写調節能の指標とすることを特徴とする被検体の該転写調節能の評価方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ヒトⅠⅠ型5 α -レダクターゼ遺伝子のプロモーターとして作用することのでき、場合によって適当なレポーター遺伝子が操作可能に連結されていてもよいDNA分子、ならびにその組換え発現ベクターおよび該ベクターを含む大腸菌または哺乳動物細胞に関する。また、本発明は、これらのDNA分

子および細胞の用途にも関する。

【0002】

【従来の技術】5 α -レダクターゼはテストステロン、4-アンドロステンジオン、プロゲステロンなどの4-エン-3-ケトステロイドの5 α 位還元を触媒する酵素である。その代表的な役割はテストステロンを最も強力な男性ホルモンである5 α -ジヒドロテストステロン(DHT)に代謝することである。DHTは胎生期における前立腺を含む男性外性器の分化や思春期における第二次性徴の出現など、特に男性において重要な生理機能を担っているが、前立腺肥大症や前立腺癌、あるいは皮膚科領域における男性型脱毛、多毛症、脂漏性皮膚炎、尋常性ざ瘡などの男性ホルモン依存性疾患に関与することも明らかになっている。これらの疾患の予防あるいは治療には、標的細胞におけるDHT産生を抑制することが有効であると考えられ、その手段として種々の5 α -レダクターゼ活性阻害物質の探索が進められている。

【0003】5 α -レダクターゼにはⅠ型およびⅠⅠ型の2種類のアイソザイムが存在することが明らかになっており、それぞれのcDNAもクローニングされている(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 3640-3644, 1990、Nature 354: 159-161, 1991)。

【0004】成人男性においてⅠ型は皮膚および肝臓において比較的強い発現を示す一方で、身体各部位においては弱い活性が広く存在している。一方、ⅠⅠ型は前立腺、副睾丸、精囊などの男性ホルモン標的組織に局在している(J. Clin. Invest. 92: 903-910, 1993)。前立腺の発達は5 α -レダクターゼにより産生されるDHTによりコントロールされているが、前立腺肥大症や前立腺癌における5 α -レダクターゼ活性の上昇も報告されている(J. Clin. Endocrinol. Metab. 67: 806-816, 1988)。近年、種々の5 α -レダクターゼ活性阻害剤が開発されてきており、特に、ⅠⅠ型5 α -レダクターゼの特異的活性阻害剤であるフィナステリド(Finasteride)がこれらの疾患に対して優れた治療効果を示すことが知られている。また、Finasterideは男性型脱毛や多毛症にも治療効果を示す(Biomed & Pharmacother 49: 319-324, 1995)。

【0005】

【発明の構成】上述のとおり、ⅠⅠ型5 α -レダクターゼ活性阻害剤は、一定の男性ホルモン依存性疾患に有効であり、それらの一部は、5 α -レダクターゼに対する阻害活性を評価することにより開発されたものもある。しかし、5 α -レダクターゼ活性阻害剤とは異なる作用点をもつ多様な薬物を提供することも望まれるであろう。

【0006】本発明者らは、かような要望に応えるため、ⅠⅠ型5 α -レダクターゼそのものの生体内での産生を調節する評価系を確立すべく検討してきた。その結果、本発明者らは、ヒトⅠⅠ型5 α -レダクターゼ遺

伝子の転写開始点については明らかにされているものの (Endocrinology 131: 1571-1573, 1992)、今まで、該転写開始点を包含する領域については十分な解析がなされていない、特定領域のポリヌクレオチドおよびその一定の改変体が該5 α -レダクターゼ遺伝子の転写調節に強く関与することを見出した。

【0007】本発明は、このような知見に基いて完成されたものである。

【0008】したがって、本発明の1の態様は、ヒトに由来する I I 型5 α -レダクターゼ遺伝子のプロモーターとして作用しうる単離されたDNA分子であって、

(a) 配列番号1で表されるDNA配列からなるポリヌクレオチドにおいて、位置1~6022番目の連続したDNA配列からなるポリヌクレオチド、(b) (a)のポリヌクレオチドのフラグメントであって、位置5952番目(T)の転写開始点を含む少なくとも約50の連続したDNA配列からなるフラグメント、ならびに

(c) (a)のポリヌクレオチドのDNA配列において、1個または複数個のヌクレオチドが置換、欠失および/または付加することにより改変されており、そして位置5952番目(T)の転写開始点を含む少なくとも約50の連続したDNA配列からなるポリヌクレオチドを包含するポリヌクレオチド、からなる群より選ばれるDNA分子に関する。

【0009】また本発明は、このようなDNA分子の用途にも関し、該DNA分子を担持する組換え発現ベクター、ならびに該DNA分子または該組換え発現ベクターを含む大腸菌または哺乳動物細胞に関する。なお、該DNA分子は、操作可能に連結されたレポーター遺伝子をさらに含んでもよい。このような、レポーター遺伝子をさらに含む場合の哺乳動物細胞を使用して各種被検体のヒト I I 型5 α -レダクターゼ転写調節能を評価しうる系を提供できる。各種被検体としては、天然有機化合物、化学合成化合物をはじめとするあらゆる化合物が包含される。かような評価系は例えば、ヒト I I 型5 α -レダクターゼ転写調節能を有する薬物のスクリーニング法に適用することもできる。

【0010】こうして本発明によれば、ヒト I I 型5 α -レダクターゼ遺伝子の発現調節機構を解明するのに役立つ手段とともに、該発現いかに関連する疾患の診断および予防・治療にも役立つばかりでなく、種々の細胞に対して優れた I I 型5 α -レダクターゼの産生能亢進(または上記転写の活性化)あるいは抑制作用(または上記転写の不活性化)を示す薬剤のスクリーニングなどに利用できる可能性もある。

【0011】

【発明の好適な形態】本明細書で使用するところの「プロモーター」の語は、転写開始反応の効率に関与するDNA側の領域を意味する。したがって、「プロモーターとして作用しうる」とは、転写調節能を有すると互換可

能に使用されており、究極的には、ヒト I I 型5 α -レダクターゼの発現を正または負に調節する、転写活性化作用および転写不活性化作用を有することを意味する。本発明では、限定されるものでないが、転写不活性化作用により重点が置かれている。

【0012】まず、本明細書で使用するところの「操作可能に連結された」とは、プロモーターまたは転写調節領域(もしくは転写調節能を有する領域)に連結された目的とするポリヌクレオチド(例えば、レポーター遺伝子)が一定の宿主細胞内で発現しうるような形態で連結されていることを意味する。一般に、ポリヌクレオチドは転写調節領域の下流に連結され、この連結に際しては、転写調節領域と目的とするポリヌクレオチドとの間に該ポリヌクレオチドの発現に悪影響を及ぼさないポリ(もしくはオリゴ)ヌクレオチドが介在してもよい。

【0013】本発明に従う単離されたDNA分子は、配列番号1で表されるDNA配列からなるポリヌクレオチドにおいて、位置1~6022番目の連続したDNA配列からなるポリヌクレオチドである。このようなポリヌクレオチドは、例えば、まず、配列番号2および3で表されるプライマーおよびヒトゲノムDNAを用いたそれ自体公知のPCR法によりヒト I I 型5 α -レダクターゼ転写開始点に近い領域のDNAフラグメントを取得し、これをジギキゲンニ標識したものをプローブとしてヒトゲノムDNAライブラリーのスクリーニングを行なう。次いで、陽性アークよりフェージDNAを調製し、これを適当な制限酵素で消化し、上記プローブを用いたサザンブロットングにより目的DNAフラグメントを同定する。このDNAフラグメントをp Bluescript II ベクターにサブクローニングすることにより調製できる。

【0014】また、本発明に従う、別の単離されたDNA分子は、上記ポリヌクレオチドのフラグメントであって、配列番号1の配列中の位置5952番目(T)の転写開始点を含む少なくとも約50の連続したDNA配列からなるフラグメントを挙げることができる。これらのフラグメントは、さらに、ヒトに由来する I I 型5 α -レダクターゼ遺伝子のプロモーターとして作用しうるものであらねばならない。これらのフラグメントは、上記要件を満たすものであればいずれのDNA分子であってもよく、また、それらの調製は、後述する実施例2に記載の方法に従って、上記転写開始点が残存するように適当な制限酵素を使用して、配列表1で表されるDNA配列からなるポリヌクレオチドを消化して取得することができる。

【0015】さらなる本発明に従う、単離されたDNA分子として、上記位置1~6022番目の連続したDNA配列からなるポリヌクレオチドの基準となるDNA配列において、1個または複数個のヌクレオチドが置換、欠失および/または付加することにより改変されてお

り、そして位置5952番目(T)の転写開始点を含む少なくとも約50の連続したDNA配列からなるポリヌクレオチドを包含するポリヌクレオチドを挙げることができる。また、これらのポリヌクレオチドも、ヒトに由来するII型5 α -レダクターゼ遺伝子のプロモーターとして作用しうるものであらねばならない。さらに、欠失することにより改変されたポリヌクレオチドとしては、上記のフラグメントと重複するものが除外できるように、基準となるDNA配列が中断されるように、好ましくは1個または数個のヌクレオチドが欠失されている配列からなるポリヌクレオチドを挙げることができる。欠失する箇所は、上記の要件、すなわち転写開始点が残存し、かつ、プロモーターとして作用しうるものであれば、その場所および数を問わないが、通常、後述する複数存在する転写因子結合モチーフの1個または2個以上がそれらの機能を失う(すなわち、対応する転写因子が結合できなくなる)ような位置であることが好ましい。

【0016】他方、置換は、上記要件を満たすものであれば、基準となるDNA配列中の1箇所または2箇所以上の塩基(A、T、C、G)がいずれか他の塩基で置換されていてもよく、また、これらの置換は2個以上の連続する塩基の置換であってもよい。これらの置換も、上記転写因子結合モチーフの1部が機能を失うように起こすことができる。さらに、付加は、5'末端もしくは3'末端へのヌクレオチドまたはポリもしくはオリゴヌクレオチドの付加、ならびに基準となるDNA配列の途中に上記ヌクレオチド等が割り込むように付加されている場合を包含する。勿論のこと、上記要件を満たすことも求められる。

【0017】これらの置換、欠失および付加は、それらの2種以上が同時に起こっていてもよく、制限酵素による消化とリガーゼによる連結、部位特異的変異の導入、PCR等のそれら自体周知の技術によりもたすことができる。

【0018】以上の単離されたDNA分子は、さらに操作可能に連結されたレポーター遺伝子を含んでもよい。通常は、DNA分子の下流にフレームを合わせた状態でレポーター遺伝子が、場合によって該遺伝子の発現に悪影響を及ぼさないヌクレオチド配列を介して、連結される。レポーター遺伝子は、当該技術分野で公知のいずれであってもよいが、それらの発現を容易に検出できるものが好ましく、限定されるものでないが、ルシフェラーゼ遺伝子や β -ガラクトシダーゼ遺伝子を挙げることができる。上記連結方法もそれ自体公知の方法を利用できる。

【0019】本発明に従えば、上記DNA分子または該DNA分子が操作可能に連結されたレポーター遺伝子を含む構造物を担持するベクター、好ましくは発現ベクターも提供される。このようなベクターの1種類はプラスミドであり、別の種類のベクターはウイルス由来のベク

ターであることができる。これらのベクターは、導入された宿主細胞内で自律複製できる。本明細書では、このようなベクターを発現ベクターまたは組換え発現ベクターと称している。

【0020】このような発現ベクターの構築に使用できるベクターとしては、その後トランスフェクションすべき宿主細胞に応じて、多種多様のベクターを使用できるが、本発明の目的上、大腸菌を宿主として利用できる場合には、例えばpBluescript II(ストラタジーン社製)が、そして哺乳動物細胞を宿主として利用する場合には、例えばpGL3 basicベクター(プロメガ社製品)を都合よく使用することができる。かような発現ベクターの構築もそれ自体周知の方法に準じて行なうことができる。

【0021】本発明に従えば、さらに、上記発現ベクターもしくは組換え発現ベクター、または上述のレポーター遺伝子が操作可能に連結されていてもよいDNA分子を含む大腸菌または哺乳動物細胞も提供される。発現ベクターやDNA分子からなる外来のDNA分子の宿主細胞(大腸菌または哺乳動物細胞)への導入またはトランスフェクションもまた、それ自体公知の方法にしたがって行うことができる。これらの方法には、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウム共沈殿、DEAE-デキストラン-媒介トランスフェクション、リポフェクションまたは電気穿孔を挙げることができる。宿主細胞の適当な形質転換またはトランスフェクション法は、Sambrookら、(モレキュラークローニング: アラボラトリーマニュアル、第2版、コールドスプリングハーバーラボラトリー、コールドスプリングハーバーラボラトリー出版、コールドスプリングハーバー、NY、1989)および他のラボラトリーマニュアルに見いだすことができる。

【0022】上記外来のDNA分子が導入された大腸菌(例えばJM109株)は、該DNA分子を増幅するのに役立つ一方で、哺乳動物細胞は、後述するように、被検体のヒトII型5 α -レダクターゼ転写調節能の評価方法に役立てることができる。このような目的を達成するために使用できる哺乳動物細胞としては、ヒト前立腺ストローマ細胞、ヒト包皮線維芽細胞、ヒト毛乳頭細胞などを挙げることができる。

【0023】上記評価方法は、上記のDNA分子(特に、レポーター遺伝子を含む)が導入された哺乳動物細胞を、被検体の存在下で培養し、そして培養物におけるレポーター遺伝子の発現の程度の多寡を被検体のヒトII型5 α -レダクターゼ転写調節能の指標とすることによって行うことができる。レポーター遺伝子の発現の程度は、使用するレポーター遺伝子に応じる適当な検出手段で発現産物のレベルを測定し、そして、その発現の程度の多寡は、例えば、被検体が存在しないことを除いて、その他は同一の培養条件で培養を行って得られる培養物(対照)におけるレポーター遺伝子の発現の程度と

比較することによって決定することができる。培養も、使用する宿主細胞の種類に応じて、当該技術分野で公知の条件下で行うことができる。

【0024】なお、上記の評価方法は、ハイスループットスクリーニング (high through put screening、Nature、384、supp、14-16、1996) などを用いた化合物ライブラリー、天然物からのⅠⅠ型5 α -レダクターゼ転写調節物質スクリーニング法に向けることができる。この細胞を化合物で適当な時間処理し、レポーター活性を測定し、活性を上昇もしくは下降させる物質をスクリーニングする。こうして得られた薬物は、例えばシスエレメントあるいは転写因子に作用して直接もしくはシグナル伝達系の制御により間接的にヒトⅠⅠ型5 α -レダクターゼの発現を調節することができるであろう。

【0025】さらに、配列番号1に表されるDNA配列について、例えばTRANSFAC等のデータベースを基に転写因子結合モチーフの検索を行なうことにより、ⅠⅠ型5 α -レダクターゼの転写制御に関与する転写因子を予測することができる。実際に配列番号1に表される全DNA配列について検索を行なったところ、SP-1、AP-1、CREBP1、Nkx-2.5、SOX5などをはじめとする多数の転写因子結合モチーフの存在を認めた。これらの転写因子はⅠⅠ型5 α -レダクターゼ転写制御領域中のシスエレメントに作用してⅠⅠ型5 α -レダクターゼの転写を亢進または抑制するものと考えられる。したがって、これらの転写因子の産生を制御する物質、あるいは転写因子のシスエレメントへの結合を阻害する物質もⅠⅠ型5 α -レダクターゼ転写制御物質として有用であろう。

【0026】実際に、これらの転写因子がⅠⅠ型5 α -レダクターゼの発現を制御している例として、SRY (Sex determining region Y) によるⅠⅠ型5 α -レダクターゼの発現亢進を挙げることができる。具体的な結果を実施例5に示す。したがって、SRYの産生阻害あるいはSRYとシスエレメントとの結合阻害を作用点とする物質はⅠⅠ型5 α -レダクターゼ転写抑制物質として有用であろう。

【0027】したがって、本発明によれば、配列番号1で表されるDNA配列中に存在する転写因子結合モチーフに対する転写因子をコードする単離されたDNA分子を含有する発現ベクターを、導入した哺乳動物細胞を培養することによるヒトⅠⅠ型5 α -レダクターゼの発現の亢進および抑制方法ならびに該方法を被検体の存在下で行い、該被検体の存在に起因して変化するヒトⅠⅠ型5 α -レダクターゼの発現量の多寡を該被検体のヒトⅠⅠ型5 α -レダクターゼ転写調節能の指標とすることを特徴とする被検体の該転写調節能の評価方法も提供される。この評価方法もまた、ⅠⅠ型5 α -レダクターゼの転写調節物質のスクリーニング方法に向けることもできる。上記評価方法で転写因子結合モチーフに対する転

写因子をコードするDNA分子を含有する発現ベクターが導入される哺乳動物細胞としては、外来のDNA分子として操作可能にレポーター遺伝子が連結した前記DNA分子を含んでいてもよい、ヒト前立腺ストローマ細胞、ヒト包皮線維芽細胞、ヒト毛乳頭細胞などを挙げるることができる。

【0028】本発明のスクリーニング方法で得られるⅠⅠ型5 α -レダクターゼ転写抑制物質は、前立腺肥大や前立腺癌、あるいは男性型脱毛症などの男性ホルモン依存性疾患の予防および治療に有効であろう。

【0029】

【実施例】次に実施例を示して本発明を具体的に説明するが、本発明の範囲はこれによって限定されるものではない。

実施例1: ヒトⅠⅠ型5 α -レダクターゼゲノムDNAのクローニング

配列番号2および3で示されるプライマーおよびヒト胎盤ゲノムDNAを用いたPCR法により、配列番号4に示すヒトⅠⅠ型5 α -レダクターゼ転写開始点に近い領域のDNAフラグメントの取得した。これをジゴキシゲン標識したものをプローブとしてヒトゲノムDNAライブラリーのスクリーニングを行なった。具体的にはクロンテック社製ヒトゲノムDNAライブラリー (ベクター: EMBL3 SP6/T7) を大腸菌K802株に感染させた後、プラークを形成させ、これをナイロンメンブランに転写し、上記プローブを用いてハイブリダイゼーションを行なった。検出にはアルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲン抗体 (ロシュ・ダイアグノスティックス社製) を用いた発色反応をおこなった。約200万個のプラークをスクリーニングした結果、#1および#2の2個の陽性プラークを取得した。これらよりファージDNAを調製し、これを種々の制限酵素で消化した後、上記プローブを用いたサザンブロッティングを行なった結果、複数のDNA断片が陽性を示した。このうち#1のファージDNAをBamHIで消化することにより得られた約8kbのDNA断片が、ヒトⅠⅠ型5 α -レダクターゼ遺伝子の既知塩基配列および制限酵素マップにより、転写開始点を含む5'上流域を最も長くカバーしていることが確認されたので、以後の実験にはこのDNA断片を用いた。このDNA断片をEcoRI消化して得られた約6.2kbの断片を同様にBamHIおよびEcoRIで消化したpBluescript ⅠⅠベクターにサブクローニングした。このプラスミドをp6.2BSと命名した。約6.2kbの挿入断片の全塩基配列を配列番号1に、さらにその構造を図1示した。

実施例2: ヒトⅠⅠ型5 α -レダクターゼプロモーターとルシフェラーゼレポーター遺伝子を連結させたレポータープラスミドの構築

配列番号1に示すDNA断片はヒトⅠⅠ型5 α -レダク

ターゼ遺伝子の5' 上流領域に加え、翻訳開始コドン (ATG) 以降の構造遺伝子の一部 (配列番号1に示される6023番から6224番) も含んでいるため、このままルシフェラーゼ遺伝子を連結したのではフレームシフトによりルシフェラーゼの発現が期待できない。そこで、p6. 2BSプラスミドよりII型5 α -レダクターゼの構造遺伝子部分を除く操作を以下の通り行なった。まず、p6. 2BSプラスミドをSacIIで消化することにより、配列番号1に示される5823番のSacIIサイトからpBluescript II由来のSacIIサイトまでを除いた。一方、5' 末端にSacII認識配列をつけた配列番号5および配列番号6に示されるPCRプライマーを用いてp6. 2BSプラスミドを鋳型としてPCR反応を行ない、配列番号1に示される5820番の塩基「C」(SacIIサイトの3塩基前) から翻訳開始点直前の6022番の塩基「G」までのDNA断片を得た。この断片をSacIIで消化した後、上記の通りSacIIで消化したp6. 2BSプラスミドにライゲーションした。挿入断片の方向を確認し、配列番号1と同じクローンを選んだ。このプラスミドをp6. 0BSと命名した。次に、p6. 0BSプラスミドをBssHIIで消化して得られた約6 kbのヒトII型5 α -レダクターゼ転写調節領域のDNA断片を、KpnIおよびHindIIIで消化したpGL3 basicベクターにサブクローニングした。こうして得られたプラスミドをpRedII-Lucと命名した。さらに、pRedII-Lucを制限酵素消化することにより、挿入されているII型5 α -レダクターゼ転写調節領域DNA中の切断点より5' 側を除いた後、セルフライゲーションさせたpRedII-Lucの変異体を作製した。実際に作製した変異体プラスミドの名称と作製のために用いた制限酵素を表1に示す。

【0030】

【表1】

表 1

| プラスミド名 | 制限酵素 |
|--------------------|---------------|
| pRedII/ApaI-Luc | ApaI |
| pRedII/SnaBI-Luc | SnaBI, XhoI |
| pRedII/PstI-Luc | PstI, XhoI |
| pRedII/BalI-Luc | BalI, XhoI |
| pRedII/NsiI-Luc | NsiI, XhoI |
| pRedII/BstXI-Luc | BstXI, XhoI |
| pRedII/HindIII-Luc | HindIII, XhoI |
| pRedII/PfIMI-Luc | PfIMI, XhoI |
| pRedII/KpnI-Luc | KpnI |
| pRedII/Eco065I-Luc | Eco065I, XhoI |
| pRedII/StuI-Luc | StuI, XhoI |

【0031】実施例3: ヒトII型5 α -レダクターゼプロモーター活性の測定

この実施例では、ヒト培養毛乳頭細胞にトランスフェクションした上記の各レポータープラスミドのプロモーター活性を測定した。

【0032】まず、トランスフェクション前日に細胞数を一定にして24穴プレートに播種した。翌日、各プラスミドおよび遺伝子の導入効率測定用の内部コントロールとしての β -ガラクトシターゼ遺伝子を含んだpSV- β -Galactosidase Contorol Vector (プロメガ社製) をリポフェクトアミンプラス試薬 (ライフテックオリエンタル社製) と混合し、細胞に添加し、遺伝子導入した。24~48時間培養した後、細胞を溶解しルシフェラーゼ活性および β -ガラクトシターゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性はピッカジーン発光キット (東洋インキ製) を用いて、 β -ガラクトシターゼ活性は発色基質であるCPRGを用いて測定した。その結果を表2に示す。プロモーター活性は、ルシフェラーゼ活性を β -ガラクトシターゼ活性で補正し、さらにpRedII-Lucのプロモーター活性に対する相対値としてあらわした。なお、転写開始点を含め約-60bp付近までのDNAフラグメントも、強いプロモーター活性を有することが確認されている。

【0033】

【表2】

表 2

| プラスミド名 | 転写開始点から転写調節領域 3' 末端までのサイズ (bp) | プロモーター活性 |
|--------------------|--------------------------------|----------|
| pRedII-Luc | 5952 | 100 |
| pRedII/ApaI-Luc | 4703 | 587 |
| pRedII/SnaBI-Luc | 3553 | 393 |
| pRedII/PstI-Luc | 2949 | 1380 |
| pRedII/BalI-Luc | 2370 | 1512 |
| pRedII/NsiI-Luc | 2093 | 1586 |
| pRedII/BstXI-Luc | 1783 | 1385 |
| pRedII/HindIII-Luc | 1576 | 1652 |
| pRedII/PfI-MI-Luc | 837 | 1943 |
| pRedII/KpnI-Luc | 570 | 2362 |
| pRedII/Eco065I-Luc | 346 | 2763 |
| pRedII/StuI-Luc | 149 | 2822 |
| pGL3 basic | - | 0 |

【0034】実施例4：II型5 α -レダクターゼ転写制御物質のスクリーニング

実施例3と同様に、毛乳頭細胞にpRedII-LucおよびpSV- β -Galactosidase Control Vectorをトランスフェクションする。24時間後に種々の物質を添加しさらに24～48時間培養する。その後、実施例3と同様の方法でプロモーター活性を測定する。このようにしてII型5 α -レダクターゼ発現を亢進もしくは抑制させる種々の物質をスクリーニングすることができる。

実施例5：転写因子SRY (Sex determining regionY) によるII型5 α -レダクターゼの転写亢進

II型5 α -レダクターゼ転写調節領域DNAの塩基配列についてTRANSFACデータベースを基に転写因子結合モチーフの検索を行なった結果、転写因子SRYの結合モチーフを認め、SRYによるII型5 α -レダクターゼの転写調節の可能性が示唆された。そこでSRYの過剰発現によるII型5 α -レダクターゼの発現変動を毛乳頭細胞を用いて検討した。具体的には、まず5'末端にEcoRI認識配列をつけた配列番号7および配列番号8に示されるPCRプライマーを用いてヒトゲノムDNAを鋳型としてSRY構造遺伝子全長を取得した。この断片をEcoRIで消化した後、同様にEcoRIで消化した発現ベクターpVP22/myc-His (インビトロジェン社製) にサブクローニングし

た。このプラスミドをpVP22-SRY/myc-Hisと命名した。pVP22-SRY/myc-HisおよびネガティブコントロールとしてpVP22/myc-Hisを実施例3と同様の方法でそれぞれ培養毛乳頭細胞にトランスフェクションした。48時間培養した後、細胞を回収しRNAを抽出し、RT-PCR法によりSRYおよびII型5 α -レダクターゼのmRNA発現を検討した。その結果を図2に示す。pVP22-SRY/myc-Hisの導入によりSRYは約10倍に、II型5 α -レダクターゼは約4倍に発現量が増大した。この結果より、SRYはII型5 α -レダクターゼの発現を亢進させることが明らかになった。

【0035】

【発明の効果】本発明によれば、ヒトII型5 α -レダクターゼのプロモーターを含んだ5'上流遺伝子と適切なレポーター遺伝子を連結させた組換え発現ベクターを導入した動物細胞を用い、レポーター活性を指標にしてヒトII型5 α -レダクターゼの発現を正または負に制御する物質をスクリーニングすることができる。特に、II型5 α -レダクターゼ遺伝子の発現を抑制する物質は、前立腺肥大や前立腺癌、あるいは男性型脱毛症などの男性ホルモン依存性疾患の予防および治療に効能を有するであろう。

【0036】

【配列表】

SEQUENCE LIST

- <110> Shiseido Co., Ltd.
- <120> ヒトII型5 α -レダクターゼのプロモーター遺伝子およびその用途
- <130> 200007102
- <160> 8
- <210> 1
- <211> 6224
- <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

gaattctctg tctgaatggt cctatgtctt gtttctccag gattggtcca tggcgcctta   60
cttagttcat ttggtgaagt catgttttcc tggattatct tgatacttgt aaatgttctt  120
tgggttagg atttattgta gtcttcactg tctgtgtttt ttgttccctg tctccttgg  180
gatggatttt cagatatattg aaaagaccgg agtattttga tctatgctgt atctgcttta  240
gagggtacca caatcccagt aatgctatgg ttcttgctgt ttctagatgt actgctttga  300
tggctcttga caagatccag gataattctc tggattacca ggcagatact cttattttct  360
ttccttactt tctcccaaac agagtccttc tgcagttct gagacacctg aagctaggag  420
tggagtgaac ccagcaccac ggaggacacc accactatga ctgtgctcag ccagacttga  480
agccagcaca aactgggtc ttccctgctg taaccactcc ctggccactg cctatgtttg  540
ctcaaggcct tggggctcta caataacag gtggaagaac catccaggtc tgtgcccttc  600
ccttcagggt ggcaagtcc cccaagcccc aggtgggtcc agagatgttg tctaggagtc  660
agggactaga gtaaaaaacc ttgaaagtct acctggcatt ctattgtatt aaaattgagc  720
tgggggggac tgggggaaa gtgtggagg ggagtgggg ataaaagact acacattggg  780
tacggcgtac accgttggg tgatgggac caaaatctca gaaatcacca ctaagaactt  840
atctgtgtaa ccaaacacca cctgttcccc aaaaacctat tgaaataata ataataataa  900
ataataataa aatgaataaa caaaaacact gagctggcac tcaaaccaca aaacacagtc  960
tttcccactc ttctctccc tgtccaaagg cagaggagcc tcaactccaca gccacaaga 1020
agtactgctg gattatcaat ggtattcatt taaggcagaa agcctattaa gtcagctggt 1080
ggtgactgct gcctggcctg ggactcactc tttggggcag tgggtctccc tgttgcccca 1140
ggaaaggtct agaaatgctg ttgaagagtc aactcttga atcaagggcc cccaagagct 1200
tgcttggtgc ttacctccc tgtgctgag ccagtacctg aaaccagcta gtctcagagg 1260
ctcaccacag gcccttgatg tagtatctgg gtaactctgc tggttattca gagccaaagg 1320
gcttttcagc tagcaggtga tgaacgtgc catgactggg tctttccctt caaagcagtg 1380
ggttcccttc tggcccaggg tgtttctagg aatgtcacct ggaagctagg gcctggaaca 1440
gggacctcat tattctgact ggtgccatat ctgttgtgag tgagctgcta tccaagatgc 1500
aaggcagagt ctctcaact ctttctctc ctcttctcaa gcagcaggaa ggggtctctt 1560
ttagagttgt gagttgtgca gcctgggatt ggggaggggt gatgccaga ctcccttggc 1620
tgccccagct ggggtgtctc gtatatattg caccctcag tccactgtct ctggccctag 1680
ttcagtacta ggacttgtct aagaattgca gttcttttgg cctaaactgc ctttcaggtt 1740
tagtcagaga tccagagcac ttcagccctc agtggtagg ttgtgggaa ctgaaattct 1800
gactgctgga attagtatt cccttttggc tgggactggt ttgaatgctc ctttatgtg 1860
tgggcatcag ctgaactttg tctggctttc ctttttctg taacaggaca aactgagtt 1920
taatgctca ccattgatgt gttctccctc acccagtcca cgaatgct ctttgacca 1980
caccacagct gccagggtgt gatggagggg tggcttcagt gttcaagac tccttctgca 2040
accttttcag tgccttttgc agcaacacaa agttaaagc aggtactgca agtgetcaat 2100
tgagtttttg ttcttgtgaa ggagcttgc ttgcacagat agttgttaaa ttggtgtcct 2160
tgttggggaa acaatcagtg gagccttcta ttccaccatc ttgtccacc tcccatagta 2220
ctatacatct cttcttttgg ctagtctgt ttggatattt ttgtataat aaaactgtag 2280
ttgtaagtat agtgcttcc agagttcttt aattttttt agtgaattat caagcttgaa 2340
gggttagtgg ggattcctaa atatgtagc cagctgttla gaagtatagg tagcttacgt 2400
aaccttgaac ttgcagctga tgtctgaagt aaggacagtg ttatggagga ccatgtcctt 2460
aacttttgaa gtttgctca actctagtag ttgttgcac aagttgatgt aacatgccta 2520
gtaattttag gaatgctgga tattgtaaag gctatattct tacttgctg gatttaattg 2580
acttcttta aacagtggtg gactgtgta ggttacttgt gactcatctt gatccttttg 2640
gggattgat tttatgttt gttaagaaga tagcttttat tctacctaat tccaatactc 2700
ttagatcat ttctactact aaacctggg cltctgggat ctccagcta gctgttctct 2760
ggagattata aatgactcta acacatcttt catatgcaa ccaactaatt cagggtcat 2820
acgttcccca accatttct ttatcaggac tctacacct ggccactat tctcctgcc 2880

```


taatcagcca ggtccaggta acagaaaagt aaagacagcc gctgtacccc agagcctgct 2940
 aaaagtattc aaacgagcta atcctaagcc tgattacett gtcagccca ctctttccctg 3000
 cagaaactac agtaaaggct cttgccacc ttgaccctc actccggctg cctcctaaca 3060
 ctggtgcttc tccatgtggg cttgggtggt gtgctgtgtc ttctgtttgt agggatctgt 3120
 cgatataaac cttttccttc acgatatgca tttctgtgtc tgcataatgt accacattga 3180
 ttaaaaagag taagtactgt atgattccac ttacccgaaa ttcaaaagca gacaaaatta 3240
 acttatggtg ttagaagtca gggtagtgtt gttttttttt ttgtcttttt tttttttttt 3300
 ttttttctg gaaggaggat gtaaggagcc aggagcacag atcctgatat gctgataatc 3360
 tgtatcttga cctaggtgca gcttgcaaga gggtgttcag ttgtgcaaa tcaaccaagc 3420
 tgtatattta taattgggca ctttcttctt gcatgtaata cagaccagtt gcattattgg 3480
 ttccaatttt ctacctcca ctatatccct gccctttacc atgtaacttt acaaatagtc 3540
 tctcactttg gctctagaat ccacatatg acttgatttg gccaatacaa taaataggaa 3600
 gtaagggtgt gcttgttctt ggcctgagcc tgaagagccc ttgtgtgttt cttctactct 3660
 cgtacttttg ttattaacat tatatagaca tgggtggagct agctcactca tcccaggatg 3720
 agagcctcag ctaagtttct ccatecaaac acagcctgga gctgggctct aacttgttac 3780
 acagatgaat gagtgaatat tgttaagata agtcaagccc agcccagatt tctgaccac 3840
 agccaaccca cagatgcata agctgaagat gactggtttt atcaagctaa ttgttataat 3900
 agtgagaaaa agatcatgag gacaaaaagt gggcagagtc ggaagaaaa agaggaagaa 3960
 attgagacag aagacatttc atttaaaaa aatattccat tgagctgggt ttgaaatagt 4020
 gcactgcctg ttctcetaat gctgtatggt gtcataaat ctattgttta ctgagtctat 4080
 gagccagctt cctagggagg ctatggcaat tgaggacagg gaagaggtaa cactcaggaa 4140
 catagaagga gaatttgggt ccaagtgggt ggagggaaaa ataactgggt ttagttttgg 4200
 gtagggctgg ttttaggtc tctgaaggac atgtaagtgg agttttccag caggagaaaa 4260
 acgcagagct aaagtcata tctttgctgg caatctagat ttgggcactc tcaacaagca 4320
 ggtttagct gaggaagctg ggactggact tgtactctaa agccagtgca aaaaaagctt 4380
 gaaacggcta tgatggctaa gacctggctt ttccatgaaa aatgcttcgg tcagtatgag 4440
 tgattccaaa gtggtgatca attaaaaact gaagtatgat tagcattaat tataacccaa 4500
 tgggaatatg ataacgact cttggtcagc aagcagaggg tgcctgtag tgctaaagca 4560
 tcaccatata ccatgtgtgc caagaatcag gagacacccc aaacgggagc agatgagggg 4620
 ttgtgtctgt cattggacca gctggcctga tccagcagaa gtggatggag atacactgaa 4680
 tggggctcct gggagcgctg agttgaaggg gaaggaagag aagagacctc caaagtaagg 4740
 gaagagttaa aatgagaag gactggggtg gagccccaag tagggaccag aggagaaaac 4800
 agggataaag taatcaaggg agatgggaca ggaagatgaa agaattgaggt aaacagcagg 4860
 tgggaagagg aggtcaacct aaaggagaaa gccgggtcga agaaagaagg aagagaagaa 4920
 aagaagggtt gggaaacaga ggaggaggca gccaaagaa cctggagct gaatcataga 4980
 acggaagagg tagaagacgg aggggctgga ggataacata aagtgaggaa acggaagaga 5040
 gaaagaaccg cgtctgcgtg tatgacggct agacaggagt tcagagaaca gcggggtcgc 5100
 caggccacca cctgatgggc cagcgctcat tggtcttagg agctgggaaa gggcaccaca 5160
 ggaaagaagc cctagacttt agcctgagtc tgggccactc taggggaccg ggagtgggt 5220
 ggcgggagag gacgcgcaga atctcgactt ctggcccaa tetgtcatg atcacccgag 5280
 ctacgcggac gtcctctct gacccaggca ggcggctcag ggacgcgtgc gggatgcag 5340
 agagaaaccg ctgaggaatt agggccggga gagactggtt cctgccgggg gcgtgtggtg 5400
 gggcagagct ggcactgatg ctgagagtgg ctaaggagcg cgccgcccc gagcagaagg 5460
 gctggcagac gctcagagag ccaggatggt tcagggtcca aggaaggtec tatgttgggt 5520
 gsgagctgtg agggagttaa agtgcagag gaaccggagg agalgaaag accttgctt 5580
 gggtgttcga ggggtggact gcgtggtgac cgacggcaca gaggtgtgt gttggggcgg 5640
 aagaaccacc ccagctgaat cgtccccgtg gggttttctt cccgtgtctt agttccagaa 5700
 gttgccgat cagacgctaa tagttgagga acaagtcag gaaggacagc ctaagcggga 5760
 ggtgaatgta aagccgtgga gagggcgggc gaactaagaa ggccctcgtt ctctccggc 5820
 caccgcggct gcattcttga gaaagggtta ttgctgcgaa gccgcgccag ggctggacgc 5880

```

ggcgaggtgg gaggcaggat ggaggggagg gagccaaggc cgagggggcg gacacgggtg 5940
gcgtctggcg ctccataaag cgggtgcggg ggccgcgctc tcttctggga gggcagcggc 6000
caccggcgag gaacacggcg cg atg cag gtt cag tgc cag cag agc cca gtg 6052
      Met Gln Val Gln Cys Gln Gln Ser Pro Val
      1          5          10
ctg gca ggc agc gcc act ttg gtc gcc ett ggg gca ctg gcc ttg tac 6100
Leu Ala Gly Ser Ala Thr Leu Val Ala Leu Gly Ala Leu Ala Leu Tyr
      15          20          25
gtc gcg aag ccc tcc ggc tac ggg aag cac acg gag agc ctg aag ccg 6148
Val Ala Lys Pro Ser Gly Tyr Gly Lys His Thr Glu Ser Leu Lys Pro
      30          35          40
gcg gct acc cgc ctg cca gcc cgc gcc gcc tgg ttc ctg cag gag ctg 6196
Ala Ala Thr Arg Leu Pro Ala Arg Ala Ala Trp Phe Leu Gln Glu Leu
      45          50          55
cct tcc ttc gcg gtg ccc gcg ggg atc c 6224
Pro Ser Phe Ala Val Pro Ala Gly Ile
      60          65
<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> ヒト I I 型 5  $\alpha$ -レダクターゼの転写開始点付近の配列を参考にして合成
<400> 2
gaaaccgctg aggaattagg 20
<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> ヒト I I 型 5  $\alpha$ -レダクターゼの転写開始点付近の配列を参考にして合成
<400> 3
ttcgagcaa taccctttc 20
<210> 4
<211> 517
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 4
gaaaccgctg aggaattagg gccggagag actgtacct gccggggcg tgtgtgggg 60
cagagctggc actgatgctg agagtggcta aggagcgcg cgccccagag cagaagggt 120
ggcagacgct cagagagcca gcatgttca ggtccaagg aaggtcctat gttgggtggg 180
agctgtgagg gagtgaagt gcatgaggaa ccgaggaga tggaagacc ttggttggg 240
tgttcgaggg tgggactcgc tggtagccga cggcacagag ggtgtgtgtt gggcggaag 300
aaccacccca gctgaatcgt cccgtgggg ttttcttccc gtgtcttagt tccagaagtt 360
gccgcatcag acgctaatag ttgaggaaca agtcatggaa ggacagccta agcgggaggt 420
gaatgtaaag ccgtggagag ggccggcgaa ctaagaagc cttcgttctc ctccggccac 480
cgcgctgca tccttgagaa aggggtattg ctgcgaa 517
<210> 5
<211> 35
<212> DNA

```

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ヒト I I 型 5 α -レダクターゼの転写開始点付近の配列を参考にして合成

<400> 5

ccaccgcggc tgcaccttg agaaagggt attgc 35

<210> 6

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ヒト I I 型 5 α -レダクターゼの転写開始点付近の配列を参考にして合成

<400> 6

tttccgcggc gcgccgtgtt cctcgccgtt ggccg 35

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ヒト SRY の cDNA 塩基配列 (翻訳開始点付近) を参考にして合成

<400> 7

ggaattctat gcaatcatat gcttctgcta 30

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ヒト SRY の cDNA 塩基配列 (ストップコドン付近) を参考にして合成

<400> 8

agaattcagc ttgtccagt ggctgttagcg 30

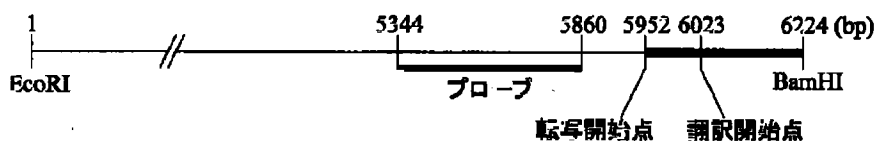
【図面の簡単な説明】

【図1】配列番号1に示すヒト I I 型 5 α -レダクターゼ遺伝子5' 上流領域の構造を示す、プローブはヒトゲノムライブラリーのスクリーニングに用いたものであ

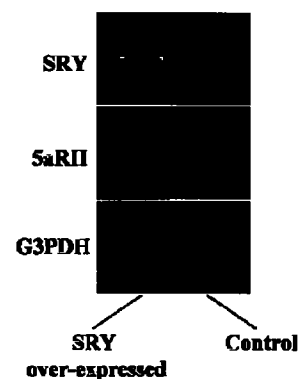
る。

【図2】実施例5に示す、培養ヒト毛乳頭細胞における SRY 過剰発現実験の結果である。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 DA02 DA06
EA04 FA02 GA11
4B063 QA01 QA18 QQ20 QR60 QR77
QR80 QX01
4B065 AA26X AA90X AA93Y AB01
AC14 CA46